Clin. Med. Gen. del R. Ist. di Studî super. di Firenze
diretto dal Prof. P. Grocco

6

Intorno al meccanismo di azione

dei principî tiroidei

nella tubercolosi sperimentale

Dott. Cesare Frugoni, *Aiuto.*

Estratto da "*il Tommasi*,, Giorn. di Biologia, Medicina e Chir.
Anno IV. N. 21 - 1909





NAPOLI
Stabilimento Lito-Tipografico G. Civelli
1909.

Clin. Med. Gen. del R. Ist. di Studî super. di Firenze
diretto dal Prof. P. Grocco

Intorno al meccanismo di azione

dei principî tiroidei

nella tubercolosi sperimentale

Dott. Cesare Frugoni, *Aiuto.*

Estratto da "*il Tommasi*,, Giorn. di Biologia, Medicina e Chir.
Anno IV. N. 21 - 1909





NAPOLI
Stabilimento Lito-Tipografico G. Civelli
1909

Intorno al meccanismo di azione dei principî tiroidei nella tubercolosi sperimentale.

In precedenti memorie (1-2-3) pubblicate in collaborazione col Dott. Grixoni e intese a studiare alcuni almeno dei molteplici rapporti che, sulla base di largo materiale bibliografico e critico, dimostrammo intercorrere fra infezione tubercolare e tiroide, abbiamo ripetutamente richiamata l'attenzione su di alcuni reperti sperimentali da noi ottenuti e che ci parvero di un qualche interesse.

Infatti, in ricerche da noi intraprese guidati da quei criteri che già altre volte esponemmo e che per brevità non ripeteremo, rimandando alle nostre pubblicazioni in proposito, noi potemmo fra l'altro stabi-

(1) Frugoni u. Grixoni. — Günstiger Einfluss der Wirksame Elemente der Schilddrüse auf die experimentellen tuberkulösen und pseudotuberkulösen Infektionen. Berliner Klinische Wochenschrift, 1909, N. 25, S. 1160.

(2) Frugoni e Grixoni. — Idem, idem. Riv. Critica Clinica Med. 909. N. 24, p. 352.

(3) Frugoni e Grixoni. — Idem, idem (lavoro in extenso) Biochimica e Terapia Sperimentale, 1909.

lire che « il trattamento tiroideo quotidianamente istituito da un periodo di tempo o contemporaneo o precedente all' infezione e in dosi tali da essere ad un tempo energicamente acceleratrici del ricambio organico e ben tollerate, è capace di estrinsecare una azione utilmente modificatrice sulle infezioni tubercolare e pseudo-tubercolare sperimentali nel coniglio e nella cavia, poichè gli animali sottoposti a trattamento tiroideo sopravvivono un periodo di tempo maggiore degli animali controllo, fino in qualche caso eccezionale alla sopravvivenza definitiva ».

Mi limiterò qui a richiamare che nelle nostre esperienze, che furono assai numerose e con risultati concordi, ci servimmo di tre ceppi di tubercolosi e di due di pseudo-tubercolosi, usando per i primi e per uno dei secondi (bacillo pseudotubercolare di Pfeiffer) la via endovenosa con tenui sospensioni batteriche omogenee ripetutamente filtrate per carta, e per l'altro (bacillo pseudotubercolare opale-agliaceo di Vincenzi) la via digestiva. Ma sul meccanismo di tale azione dei principi tiroidei, che definimmo utilmente modificatrice sull' evoluzione dell' infezione tubercolare e pseudotubercolare sperimentali, noi non credemmo di avanzare premature e non fondate affermazioni, pure avendo dichiarato di ritenere che « debba prendersi anche in seria considerazione la semplice azione generica dell'esaltato ricambio accanto ad una, sia pure supposta, ma non dimostrata azione particolare dei principi tiroidei sul processo tubercolare » e dichiarando che erano in corso ricerche nell'intento di stabilire, fra l'altro, quali fossero le modificazioni delle proprietà biologiche del siero sanguigno di animali più o meno a lungo tiroidizzati, di fronte al bacillo di Koch.

Tali indagini io ho pertanto compiute, studiando il potere battericida *in vitro* ed *in vivo*, l' antitossico, l'agglutinante, l'opsonico verso il bacillo tubercolare del siero di sangue di conigli ipertiroidizzati con criterio e procedimento tecnico analoghi a quelli da Spiro Li-

vierato (1) già usati nelle sue belle ricerche sulla influenza in tal guisa esercitata dalle sostanze medicamentose generalmente più in uso contro la tubercolosi (iodio, creosoto, cacodilato di soda, terebentina).

È logico infatti pensare e supporre che la somministrazione di una sostanza alla quale viene attribuita efficace azione verso un determinato processo infettivo, debba o possa modificare nelle sue proprietà anche quel mezzo organico, il siero di sangue, che noi sappiamo tradurre, nel modo il più fedele e squisitamente sensibile, le reazioni biologiche difensive dell'organismo; è ben legittima quindi una ricerca con questo indirizzo, specie poi considerando i numerosi e delicati procedimenti tecnici di indagine che, allo stato attuale delle nostre conoscenze, sono a nostra disposizione, e i quali ci permettono un'analisi ad un tempo minuta ed esatta. Nè parmi opportuno spendere altre parole per illustrare e svolgere ulteriormente questo concetto: e per vero le moderne conquiste scientifiche stanno tutte a dimostrarci quanto le qualità del siero si modifichino, si alterino, si plasmino sotto l'influenza dei più diversi fattori morbosi e no, in tal guisa ricevendone particolari impronte o generiche o specifiche, e che — rappresentando l'esponente delle reazioni organiche, l'indice delle modificazioni biologiche indotte — ci permettono di risalire dalla loro valutazione agli intimi rapporti intercorrenti tra organismo e causa efficiente, dalla quale appunto dipende l'esatta e l'intima interpretazione dei fatti. Era ben razionale quindi che prefiggendomi lo studio del meccanismo di azione dei principi tiroidei, sottoponessi a ricerca il siero di animali sani con essi trattati, a preferenza dal compiere ricerche comparative sul siero di animali tubercolizzati-tiroidizzati, in con-

(1) Spiro L vierato. — Sul modo di comportarsi verso l' infezione tubercolare sperimentale delle sostanze medicamentose comunemente usate contro la tubercolosi del p lmone. — Annali Istituto Maragliano, 907, marzo fasc. II°, Vol. II, pag. 67.

fronto di tubercolizzati-controllo, poichè in quest'ultimo caso le inevitabili differenze inerenti alla diversa intensità e svolgimento del processo morboso, alla diversa resistenza individuale, ecc., ecc. difficilmente avrebbero permesso un giudizio comparativo sicuro e scevro da cause di errore.

Le indagini furono eseguite sopra conigli sottoposti da tempo vario a trattamento tiroideo più o meno intenso per os (tabloidi di tiroidina); dal sangue raccolto sterilmente ed a tempo opportuno, separavo il siero e le necessarie indagini erano tosto praticate su materiale fresco.

Le principali norme di tecnica furono le seguenti:

Il *potere antitossico* dei sieri fu determinato dal rapporto comparativo delle ore di sopravvivenza all'inoculazione della dose mortale di tubercolina acquosa Maragliano (dosata ad 1 c.c. per Eg. di cavia, e fornitami dall'Istituto Farmacologico Italiano) di cavie controllo e di cavie che 24 ore prima avevano ricevuto per iniezione 5-6 c.c. di siero di sangue di animali tiroidizzati e del quale appunto si cercava di stabilire in tal guisa l'eventuale azione antitossica di fronte ai veleni tubercolari.

Il *potere battericida in vivo* fu determinato iniettando a quattro gruppi di cavie di cui uno, il primo, di controllo, una cultura di bacilli di Koch in dose uguale per ogni lotto e tale da provocare un'infezione lenta (3 milligr. per ettogramma di cavia, con il ceppo da noi adoperato) e rispettivamente inoculata dopo 4 (II gruppo), 12 (III gruppo), 24 ore (IV gruppo) di contatto col siero impiegato in quantità pari ad 1 cc. per ettogramma di cavia.

Il *potere battericida in vitro* fu valutato dall'esame comparativo del modo di svilupparsi di trapianti fatti nella stessa quantità e in terreni ugualmente e contemporaneamente preparati, con varie emulsioni di bacilli di Koch, di cui una di controllo e le altre dopo 24 ore di contatto a 37 con siero tiroidizzato a

dosi crescenti (rispettivamente 5-10-15 gocce su 10 c.c. di tenue emulsione).

Il *potere agglutinante* fu determinato secondo la tecnica di Arloing-Courmont, con cultura di tubercolosi omogeneizzata e a diluizioni progressive da 1/5 a 1/30, ripetendo l'osservazione a varie ore di distanza fino al mattino successivo.

Per l'*indice opsonico* seguii la tecnica indicata dal Prof. Schupfer 1 (1), servendomi di tenui emulsioni di bacilli tubercolari morti fornitimi dalla ditta Meister e Brüning, di Höchst, e calcolai sia l'*I. O. di Wright* (valutazione dei germi fagocitati da ogni leucocita e rapporto fra la cifra del siero in esame con quella del siero controllo), che l'*I. O. di Simon* (valutazione della percentuale dei leucociti fagocitanti e rapporto come sopra), come anche l'*I. O. medio di Schupfer*, che, ottenuto stabilendo la media fra l'I. O. di Wright e di Simon, ha il vantaggio di dare un criterio di giudizio riassuntivo.

Eseguii inoltre ricerche istologiche per studiare l'evoluzione del processo tubercolare in animali infettati e assoggettati a trattamento tiroideo, delle quali indagini e di altre ancora riferirò succintamente.

Determinazione del potere antitossico.

Esperienza	Cavie	Peso	Siero tiroidizzato	Tubercolina Maragliano	Morte controlli dopo ore	Morte cavie trattate dopo ore
Esp. I coniglio	controllo 1	gr. 325	——	3 25 c. c.	9. 30	——
trattato con	controllo 2	» 305	——	3. 05 c. c.	8. 30	——
tiroidina per	3	» 275	6 c. c.	2. 75 c. c.	——	7. 40
16 giorni	4	» 375	6. 5 c. c.	3. 75 c. c.	——	17. 40
Esp. II. coniglio trattato	controllo 1	gr. 380	——	3. 80 c. c.	20	——
	controllo 2	» 405	——	4. 05 c. c.	14	——
per 20 giorni	3	» 275	5 c. c.	2. 75 c. c.	——	21
	4	» 330	5 c. c.	3. 30 c. c.	——	26
Esp. III. coniglio trattato	controllo 1	gr. 310	——	3. 1 c. c.	17	——
	controllo 2	» 300	——	3. — c. c.	18	——
per 26 giorni	3	» 320	5 c. c.	3. 20 c. c.	——	15
	4	» 290	5.5 c. c.	2. 9 c. c.	——	18

(1) Prof. Ferruccio Schupfer. — Il potere opsonico degli essudati delle cavità sierose. — Il Policlinico, Sez. Med. 908, N. 11 e 12, pag. 477 e 536.

Le differenze nella resistenza all' intossicazione tubercolinica sperimentale tra cavie-controllo e cavie preventivamente trattate con siero che possiamo col Livierato convenzionalmente chiamare « medicato », essendo pertanto (come risulta dalla tabella) incostanti e sì lievi da non potersene tenere calcolo di sorta, una sola deduzione deve essere fatta e cioè che « il siero di sangue di animali tiroidizzati non riesce ad attenuare i fenomeni dell' intossicazione tubercolinica, in altre parole che il trattamento tiroideo non conferisce al siero dell' animale trattato azione antitossica di fronte ai veleni tubercolari ».

Determinazione del potere battericida in vivo

Ore di contatto fra B. Koch e siero		Peso delle cavie			Materiali iniettati: in milligr. di coltura			Materiali iniettati: in siero			Morte dopo giorni		
		Esp. I.	Esp. II.	Esp. III.	Esp. I.	Esp. II.	Esp. III.	Esp. I.	Esp. II.	Esp. III.	Esp. I.	Esp. II.	Esp. III.
Controllo	I. gruppo	395	[illegible]90	360	12	9	11	3.90	2.90	3.60	20	32	26
Controllo	I. gruppo	475	320	280	14	10	8	4.70	3.2[illegible]	2.80	31	19	29
6 ore di contatto	II. gruppo	330	[illegible]00	[illegible]40	10	9	10	3.30	3. —	3.40	28	29	31
6 » »	II. gruppo	340	29[illegible]	330	10	9	10	3.4[illegible]	2. 9	3.30	26	25	26
15 » »	III. gruppo	410	360	250	12	11	8	4.10	3.60	2.50	24	25	19
1[illegible] » »	III. gruppo	270	305	[illegible]40	8	9	10	2.70	3.05	3.40	30	26	28
24 » »	IV. gruppo	240	370	300	7	11	9	2.40	3.70	3.00	30	29	24
24 » »	IV. gruppo	370	290	310	11	[illegible]	9	3.70	2.90	3.10	25	16	25

Tutti gli animali morirono di tubercolosi, e così come non si verificarono differenze degne di speciale rilievo nella durata ed evoluzione dell'infezione, neppur si rinvenne alla necroscopia un quadro anatomo-patologico diverso a seconda che si trattava di animali inoculati con coltura sola o con coltura dopo vario contatto con siero ipertiroidizzato: il trattamento tiroideo quindi non conferisce al siero di sangue potere battericida in vivo, constatabile almeno.

Riguardo al potere battericida *in vitro* e all'agglutinante, parmi superfluo anche di riportare tabelle:

e per vero in colture fatte dopo 24 ore di contatto a 37 di una sospensione di bacilli tubercolari con dosi varie di siero, non mi fu dato di osservare nè ritardo, nè minor rigoglio di sviluppo, sempre essendosi verificato l'attecchimento non solo, ma il rapido ed uguale accrescimento della coltura. Nè peculiari aumenti mostrò il potere agglutinante chè prolungando l' osservazione potei al più constatare agglutinazioni evidenti alle diluizioni di $^1/_5$ - $^1/_{10}$ dopo 20 ore, sì da non dover loro attribuire alcun speciale valore. Il trattamento tiroideo non conferisce quindi al siero di sangue potere coibente sulle colture di bacilli di Koch, nè potere agglutinante sulle medesime.

All'opposto invece trovai che l'indice opsonico viene dal trattamento tiroideo discretamente aumentato per quanto in proporzioni più modeste di quelle affermate già da Marbé i reperti del quale pertando io non posso — nel loro complesso — che confermare.

Ricorderò che già dalle ricerche del Marbé (1) risulta I° che l' opoterapia tiroidea determina un notevole aumento dell' I. O. degli animali di fronte a vari germi patogeni e con speciale evidenza verso il bacillo tubercolare, avendosi anche più rapida disintegrazione de' germi fagocitati, mentre la tiroidectomia provocherebbe fenomeni opposti; II° che, mentre se si usano siero o globuli bianchi di mixedematosi sottoposti a cura tiroidea si ottengono valori sensibilmente uguali alla media, se si impiegano invece o leucociti provenienti da mixedematosi non soggetti a cura o il loro siero si ha indice opsonico notevolmente basso. Ed avendo osservato che si ha aumento del potere fagocitario per contatto de'globuli bianchi con estratto tiroideo e che tale potere di attivazione non va perso al calore, nè lo perdono i leucociti così sensibilizzati anche dopo ripetuti lavaggi, Marbé con-

(1) Marbé. — Per le indicazioni bibliografiche vedi miei lavori già indicati.

clude che esistono nella ghiandola tiroide dei principi termostabili aventi la proprietà di direttamente stimolare l' attività fagocitaria de' leucociti.

Ecco pertanto alcune mie esperienze che per brevità solo in parte riporto :

Determinazione I. O.

	NOTE	I. O. Wright	I. O. Simon	I. O. Schupfer
Esper. I.	Prima di ogni trattamento	0.92	0.96	0.94
	Dopo 5 giorni di »	1.30	1.42	1.36
	» 10 » »	1.64	1.60	1.62
	» 20 » »	1.52	1.60	1.56
Esper. II.	Prima di ogni trattamento	0.84	0.95	0.89
	Dopo 4 giorni di »	1.08	0.99	1.03
	» 10 » »	1.30	1.18	1.24
	» 15 » »	1.53	1.58	1.55
	» 10 » di sospensione	0.80	0.86	0.83
	» 10 » di ripresa	1.46	1.59	1.52
Esper. III.	Prima di ogni trattamento	1.06	1.15	1.10
	Dopo 5 giorni di »	1.42	1.57	1.49
	» 15 » »	1.64	1.76	1.70
	» 10 » di sospensione	0.90	0.93	0.91
	» 15 » di ripresa	1.57	1.63	1.60
	» 7 » da tiroidectomia	0.67	0.73	0.70
	» 12 » »	0.59	0.68	0.63

Dopo altri 2 giorni l' animale muore.

Per quanto nelle mie ricerche quindi non figurino quel raddoppiamento e più dell'indice opsonico che si riscontra esaminando le cifre di Marbé, risulta però in modo assai chiaro : I° che il trattamento tiroideo, entro certi limiti praticato, aumenta notevolmente l' indice opsonico del siero di sangue di fronte al bacillo tubercolare, senza che tale elevazione sia preceduta da un periodo con I. O. basso; II° che la sospensione del trattamento porta ad un I. O. più basso dell' iniziale ma che si risolleva tosto riprendendo la somministrazione di principi tiroidei ; III° che la ti-

roidectomia ne provoca all' opposto un brusco, rilevante e definitivo abbassamento.

Risulta in tal modo provata l' influenza in questo senso esercitata sopra uno dei poteri biologici del siero di sangue che ha non poco valore nella difesa dell' organismo contro le infezioni, pur non conferendo valore agli effetti da stiroidazione troppo facilmente spiegabili, in gran parte almeno, con l' effetto generico del grave trauma indotto.

Non mi parve il caso di fare determinazioni del tenore del siero in alessina che, secondo le ricerche di M.selle Fassin sarebbe notevolmente aumentato a seguito dell' ingestione o di iniezioni di principi tiroidei e diminuito (senza mai giungere alla scomparsa completa) dalla stiroidazione, con comportamento coerente, cioè all' indice opsonico.

Lo studio istologico comparativo delle lesioni anatomo-patologiche di conigli tubercolizzati-controlli, e di conigli nello stesso modo infettati (vedi precedenti lavori) ma sottoposti a trattamento tiroideo, non offrì fatti degni di particolare rilievo.

Si notano, è vero, dall' un caso all'altro differenze morfologiche e non trascurabili, ma estrema vuol essere la prudenza nel significato da attribuirsi loro: dall' esame obbiettivo dei preparati ho tratta l' impressione che si tratti per lo più soltanto di fasi diverse per il periodo o la rapidità dell' evoluzione morbosa, ma senza poter leggere nel quadro anatomo-patologico un' impronta speciale che parli per un processo a caratteri istologici propri.

Solo per i noduli splenici potei non di rado osservare nei conigli tiroidizzati un numero maggiore di macrofagi e più intensa reazione fagocitaria locale e perinodulare, alla quale volli portare particolare attenzione anche in riguardo ai risultati da me ottenuti studiando l'indice opsonico e alla recente comunicazione di Marbé (26 giugno 1909), per la quale anche indipendentemente dalle modificazioni del siero, i leu-

cociti di animali sottoposti ad opoterapia tiroidea fagocitano assai più energicamente di leocociti normali. Ma che questo fatto, pur tuttavia di non trascurabile interesse, costituisca carattere costante o differenziale, e tanto meno poi che esso ci possa senz'altro rendere ragione da solo della più lenta evoluzione dell'infezione, io non mi sentirei in alcun modo di affermare.

Tali essendo i dati, come interpretare l'azione utile all'organismo infettato, esercitata da opportuno trattamento tiroideo sul decorso ed evoluzione della infezione tubercolare sperimentale? Dalle mie ricerche è risultato che il siero di sangue di animali assoggettati da tempo vario a più o meno intensa opoterapia tiroidea non estrinseca potere antitossico, nè proprietà battericide *in vitro* ed *in vivo*, o agglutinanti di fronte al B. di Koch, poichè non riesce ad attenuare i fenomeni dell'intossicazione tubercolinica (iniezioni di dosi mortali di tubercolina acquosa Maragliano), nè quelli dell'infezione tubercolare da bacilli rimasti con esso siero a vario contatto, e non possiede manifeste proprietà agglutinanti, nè potere coibente sulle culture di bacilli tubercolari.

Solo l'indice opsonico (da me calcolato secondo i tre indici di Wright, Simon e Schupfer) è influenzato nel senso di un notevole aumento di fronte al bacillo di Koch, e questo fatto non è certo senza importanza in quanto conferisce all'organismo un efficace mezzo di difesa per aggredire il bacillo tubercolare, facilitandone la distruzione e ad un tempo ostacolandone l'attecchimento; sì che, considerando anche il reperto istologico sopra accennato, non sono alieno dall'attribuire, *fra l'altro*, a questo fattore il reperto in qualche caso osservato della sopravvivenza di qualche animale trattato, di fronte alla morte di tutti i controlli. Ma per altro non occorre esagerare l'importanza di tale reperto, indubbiamente di per sè interessante, poichè all'aumento dell' I. O. pel B. di Koch non può concedersi valore che di uno, tra fattori pro-

babilmente molteplici, che possiamo supporre ed intravedere, ma — coi nostri mezzi di ricerca — non ancora dimostrare.

Comunque va ben considerata l'azione manifestamente accelerante della tiroide sulla nutrizione e profondamente modificatrice del ricambio organico che ne è risvegliato ed attivato, ed il rapporto che l'osservazione clinica da lungo tempo ha ormai assodato intercorrere fra l'attività di questo e l'evoluzione di un'infezione tubercolare, comunque contratta, sì che scrivevamo : « .... e noi ben sappiamo quanto e come l'infezione tubercolare nella sua evoluzione, decorso ed esiti venga influenzata dalle resistenze che l'organismo, con la vivacità delle sue ossidazioni e dei poteri naturali di difesa le oppone; a tal segno da potere affermare che in nessun processo infettivo lo stato generale del ricambio organico è di tanta e sì capitale importanza, quanto nel tubercolare, e gli attuali criteri terapeutici ne sono prova evidente, al pari degli ottimi risultati di Laenicke dall'impiego di tiroidina in adeniti scrofolose ». E tale provocata attività degli scambi nutritivi appunto verificavasi nei nostri animali, e basta a dimostrarlo la loro estrema voracità e il fatto che un lieve aumento della dose ingenerava squilibrio del bilancio che si faceva allora in perdita con dimagrimento, ecc., il che del resto è di nozione comune.

Tale fatto suggerisce però una giusta riserva sulla negatività dei reperti ottenuti studiando il potere agglutinante antitossico, e battericida *in vitro* ed *in vivo* del siero di animali sani ipertiroidizzati, nel senso che non si può da esso indurrre senz'altro che nulla debba essere l'azione dei principi tiroidei su questi poteri biologici del siero in animali infettati. Teoricamente almeno, infatti, non può escludersi che quanto non fu dato di osservare in animali sani, possa invece verificarsi in ammalati, e cioè che l'intervento dei poteri naturali di difesa (formazione di

agglutinine ecc.) debba farsi più attivo sotto lo stimolo più energico di un accelerato ricambio, il che pertanto — come già dissi — non mi prefissi di determinare a causa della difficoltà (per la diversa resistenza individuale, il vario evolvere dell'infezione ecc.) di mettersi in identiche condizioni sperimentali che permettano poi deduzioni sicure e scevre da cause di errore.

Riassumendo, quindi: il rilevante aumento dell'indice opsonico di fronte al bacillo di Koch e in conseguenza l'attività con la quale si svolgono le utili reazioni fagocitarie nell'organismo infetto, ed il ravvivamento dei processi di combustione organica e del ricambio in genere e dei poteri ossidativi e di difesa in ispecie, rappresentano alcuni dei fattori probabilmente molteplici, mediante i quali i principi tiroidei esplicano quell'utile azione modificatrice, che le ricerche mie e di Grixoni hanno loro assegnata di fronte all'infezione tubercolare (e pseudotubercolare) sperimentale. È a ritenersi probabile però che altri elementi ancora concorrano a dare il medesimo risultato, ma tali che i nostri mezzi ancora non permettono con sicurezza di determinare; è probabile però — secondo quanto risulta dalle mie ricerche — che essi si svolgano al di fuori di apprezzabili modificazioni del potere battericida *in vitro* ed *in vivo*, e dell'agglutinante del siero di fronte al bacillo di Koch e del suo potere antitossico di fronte ai veleni tubercolari.

